

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

24.12.02

#3

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年12月26日

REC'D 21 FEB 2003

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-395488

[ST.10/C]:

[JP2001-395488]

出 願 人

Applicant(s):

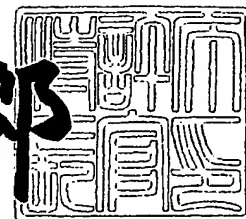
独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3004118

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 220-01328

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 高木 優

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 平津 圭一郎

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 吉川 弘之

【電話番号】 0298-61-3280

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 転写抑制ペプチド及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とする、転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いるペプチドまたはタンパク質

【請求項 2】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とする、転写因子の機能を転写抑制因子に変換するために用いるペプチドまたはタンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたはタンパク質と転写因子とが結合していることを特徴とする、転写抑制機能を有するタンパク質

【請求項 4】 請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子であって、産生される転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いる遺伝子。

【請求項 5】 請求項 3 に記載のペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の遺伝子を有する組み換えベクター。

【請求項 7】 請求項 6 の組み換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 の組み換えベクターを含む植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、転写因子を転写抑制因子に変換するためのペプチドまたはタンパク質、該ペプチドと転写因子が融合した転写抑制機能を有するタンパク質、上記ペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子、該転写抑制機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を含有する組み換えベクター、及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

生体遺伝子の mRNA への転写を抑制あるいは該遺伝子の発現を抑制する手段として、従来、例えば、アンチセンス法あるいはリボザイム法が知られており、これらの使用は、例えば、発癌遺伝子等疾病の原因となる遺伝子の発現の抑制あるいは植物の改良等において研究が進められているが、アンチセンス法においては、転写を抑制しようとする標的遺伝子あるいはこれを転写した mRNA 等の特定部位と相補的なアンチセンス DNA あるいは RNA を使用するものであり、調製されたアンチセンス DNA あるいは RNA は該標的遺伝子以外の他の遺伝子の発現抑制には使用できず、新たな標的遺伝子の配列にあわせてアンチセンス DNA あるいは RNA を調製する必要があった。

## 【0003】

また、リボザイム法も同様に、標的 DNA あるいは mRNA をリボザイムにより切断するには、該標的 DNA あるいは mRNA と結合するための相補的な配列を有し、かつ所定位置で切断可能なようにリボザイムを設計する必要があった。さらに標的を切断するように設計されたりボザイムであっても、例えば、これを、カリフラワーモザイクウイルスの 3'5' S プロモーター等のプロモーター及び転写終結配列に連結して導入ベクターを構築し、実際に、植物細胞中に導入する場合において、転写されたりボザイムに余分な配列が付加されリボザイム活性が失われる場合があった。また、これらの従来技術においては、当然のことながら標的遺伝子の特定、塩基配列の決定が不可欠となっていた。このほか、遺伝子ノックアウト法により、遺伝子の発現を抑える方法もあるが、この方法によっては例えば複 2 倍体植物においては適用ができなかった。

## 【0004】

一方、上記従来技術とは全く別のアプローチをとして、本発明者等は、シロイヌナズナ由来の AtERF4 タンパク質を転写因子に結合せしめたタンパク質が遺伝子の転写を顕著に抑制するとの知見を得、該 AtERF4 タンパク質をコードする遺伝子及びこれから切り出した DNA を含むエフェクタープラスミドを構築し、これを植物細胞に導入してすることにより、実際に遺伝子の転写を抑制することに成功し、これに基づき、これら蛋白質、ペプチド及びこれらをコードす

る遺伝子等について先に特許出願している（特願2000-109765号（特開2001-292777号公報））。

#### 【0005】

さらに、本発明者等は研究を進め、C l a s s I I E R F (ethylene Responsive element binding factor) 遺伝子群の一つであるタバコERF3、シロイヌナズナAtERF3、イネOsERFタンパク質をコードする遺伝子、及びZnフィンガータンパク (Zinc Finger Protein) の遺伝子群の一つであるシロイヌナズナZAT10、同ZAT11をコードする遺伝子について、上記と同様な試験を行ったところ、遺伝子の転写を抑制することを見いだしている。そして、これら遺伝子には、その塩基配列はまちまちではあるが、この遺伝子がコードするタンパク質あるいはペプチドには、すなわち、(L/F)DLN(L/F)(X)Pなる共通のモチーフ（但し、Xは、任意のアミノ酸残基を表す。）が存在することを明らかにしている（「The Plant Cell」Vol.13 pp1959-1968 August 2001）。

上記遺伝子のうち、タバコAtERF3遺伝子を用いた、植物における転写抑制試験について参考例に挙げる。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、上記従来技術のアンチセンス法あるいはリボザイム法等にみられる標的遺伝子の塩基配列に合わせて、その都度DNAあるいはRNAの設計を行う必要なく、簡便でかつ広く適用可能な遺伝子の転写抑制手段を提供することであり、また、本発明者等の上記研究をさらに進めて、新たな、転写抑制機能を有するペプチドあるいはタンパク質、及びこれをコードする遺伝子を提供しようとするものである。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は鋭意研究の結果、シロイヌナズナSUPERMAN（以下、SUPPという。）タンパク質は、上記した共通のモチーフと一致しないモチーフを有するが、該SUPERMANタンパク質をコードする遺伝子を上記転写因子をコ

ードする遺伝子に結合せしめたキメラ遺伝子は、強力な転写抑制機能を有するタンパク質を産生し、転写因子の機能を転写抑制機能に変換することを見だし、本発明を完成するに至ったものである。

# 【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は以下（１）～（８）に係るものである。

（１）配列番号１に示されるアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号１に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され他アミノ酸配列を有することを特徴とする、転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いるペプチドまたはタンパク質。

（２）配列番号２に示されるアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号２に示されるアミノ酸配列において、１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され他アミノ酸配列を有することを特徴とする、転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いるペプチドまたはタンパク質。

（３）上記（１）または（２）いずれか一項記載のペプチドまたはタンパク質と転写因子とが結合していることを特徴とする、転写抑制機能を有するタンパク質。

（４）上記（１）または（２）に記載のペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子であって、産生される転写因子の機能を転写抑制機能に変換するために用いる遺伝子。

（５）上記（１）または（２）に記載のペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とが結合していることを特徴とする遺伝子。

（６）請求項５に記載の遺伝子を有する組み換えベクター。

（７）請求項６の組み換えベクターを含む形質転換体。

（８）請求項７の組み換えベクターを含む植物。

# 【 0 0 0 9 】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明において遺伝子の転写を抑制するために用いるSUPタンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子は、それ自体公知であり、その全タンパク質コー

ド領域のアミノ酸配列及び対応する塩基配列を配列番号 1 に示す。該アミノ酸配列の 1 9 5 ~ 1 9 9 番目の配列（塩基配列の 5 8 3 ~ 5 9 1 に相当）は、ロイシン（L）- アスパラギン酸（D）- ロイシン（L）- グルタミン酸（E）- ロイシン（L）であり、また、この配列の 3 末端下流側にはプロリン残基を含まず、上記従来技術に示した（L/F）D L N（L/F）（X）P なるモチーフとは異なるアミノ酸配列を有する。

## 【 0 0 1 0 】

また、本件発明において使用するタンパク質あるいはペプチド、若しくは遺伝子は、配列番号 1 に示される S U P 遺伝子の全長配列を有するものに限られず、このアミノ酸配列を分子内に有する蛋白質あるいはペプチドあるいはこれらをコードする遺伝子断片であってもよい。本発明においては、配列番号 2 に示される上記 S U P 遺伝子の 1 7 5 ~ 2 0 4 番目のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する遺伝子断片を用いて、転写因子を転写抑制因子に機能変換することにも成功しており、少なくともこのアミノ酸配列を有するものであれば、転写因子の機能を抑制機能に変換し得ることが確かめられている。

## 【 0 0 1 1 】

本発明のペプチドあるいは蛋白質を任意の転写因子に結合させたキメラ蛋白質は、遺伝子の転写をトランスに抑制する。すなわち、本発明のペプチドあるいは蛋白質は転写因子の機能を転写抑制機能に変換する。

また、本発明のこれらペプチドまたは蛋白質の転写抑制機能は遺伝子の種類を問わず作用するが、本発明のこれらペプチドまたは蛋白質の転写抑制機能は、転写抑制対象の遺伝子（DNA）との結合が必要であるから、本発明のペプチドまたはタンパク質を転写因子と結合させる際、特定の遺伝子（DNA）に結合する転写因子の DNA 結合ドメインと融合させることにより、特定の遺伝子のみを標的にした転写抑制を行うことができる。

## 【 0 0 1 2 】

すなわち、転写因子にペプチドまたはタンパク質を融合させたキメラタンパク質は、転写活性化因子の DNA 結合ドメインが結合する遺伝子の転写を特異的抑制する。したがって、ある特定の遺伝子の転写抑制を行う場合、該遺伝子の転写

を支配している転写因子を選び、該転写因子に本発明のペプチドまたはタンパク質を結合せしめてキメラタンパク質を作成し、このキメラタンパク質を用いて、上記特定の遺伝子を転写を抑制すればよい。

#### 【 0 0 1 3 】

本発明の遺伝子は、配列番号 1 あるいは 2 に示されるアミノ酸配列をコードするものであれば塩基配列はどのようなものであってもよい。すなわち、本発明における転写因子の転写抑制因子への機能変換は、配列番号 1 あるいは 2 に示されるアミノ酸配列部分を含むキメラタンパク質により行われものであるから、上記これらアミノ酸配列をコードし、該アミノ酸配列部分を生成するための遺伝子であればその塩基配列は問題ではないことは容易に理解されることである。また、本発明の遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子と連結するための連結部位を設けてもよく、また本発明の遺伝子のアミノ酸読み枠と転写因子をコードする遺伝子読み枠が一致しない場合には、一致するように遺伝子を設計する。したがってそのための付加的な塩基配列を有していてもよい。

#### 【 0 0 1 4 】

また、本発明の遺伝子の転写因子に対する結合位置は、該転写因子中の DNA 結合ドメインをコードする領域の下流側であるが、この場合、該遺伝子を転写因子をコードする遺伝子に挿入しようとする場合、転写遺伝子の切断、本発明の遺伝子の連結、再結合等の面倒な操作を伴うので、該転写因子をコードする遺伝子のタンパク質領域の下流側末端に、本発明の遺伝子を単に結合するのが簡便である。この点は本発明の利点の一つでもある。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明において遺伝子の転写を抑制するには、上記キメラ蛋白質を、直接生体に導入してもよいが、例えば植物の品種改良等を行う場合、恒常的に特定遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を抑制する必要がある、上記キメラ蛋白質をコードする遺伝子を適当なベクターに連結させ、この組換えベクターを用いて植物等を形質転換するのがより効果的である。これにより、キメラ蛋白質コードする遺伝子は植物体内で恒常的に発現し、生成されたキメラ蛋白質は、遺伝子の転写を抑制し続ける。



## 【0016】

さらに、この転写抑制について、転写因子としてシロイヌナズナETHLEN-INSENSITIVE3遺伝子（以下、EIN3遺伝子という。）を用いた場合を例にとり、具体的に説明する。

EIN3遺伝子産物であるEIN3タンパク質因子は、転写因子として機能し、植物ホルモンであるエチレンによって誘導される生理作用である黄化芽生えの形態変化（トリプルレスポンス）、伸長阻害、エチレン応答性遺伝子の発現などを媒体するエチレンシグナル伝達因子である。

## 【0017】

このEIN3遺伝子（配列表における配列番号25）のタンパク質をコードする領域に、本発明のSUP遺伝子、あるいはそのロイシン-アスパラギン酸-ロイシン-グルタミン酸-ロイシンの配列のコード部分を含むよう切り出した遺伝子断片を連結して、キメラ遺伝子とし、これを、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータを有する植物形質転換用ベクターに連結し、この組み換えベクターを用いてシロイヌナズナを形質転換する。これにより、シロイヌナズナ野生株が、エチレンあるいはその前駆体である1-アミノシクロプロパン-2-カルボン酸の存在下、黄化芽生えの形態変化（トリプルレスポンス）、伸長阻害を示すのに対して、上記形質転換されたシロイヌナズナは、これらのエチレン応答性の生理作用が著しく抑制され、発現されたEIN3タンパク質は転写抑制因子として、シロイヌナズナが有しているEIN3転写活性化機能を逆に抑制機能に変換する。

本発明において、転写抑制因子に変換される転写因子及びその遺伝子は、上記EIN3とその遺伝子、酵母GAL4、ERF1、CBF1、ERF2、ERF4、EREB1等のタンパク質またはその遺伝子等が挙げられるが、本発明は特にこれらに限定されるものではなく、広く動植物、微生物の転写因子及びその遺伝子が利用可能である。

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれら実施例に限定されるものではない。

## 【0018】

## 【実施例 1】

SUP 遺伝子含有エフェクタープラスミドによる転写抑制

## (1) SUP 遺伝子の単離

SUP 遺伝子の塩基配列は、すでに報告されている。シロイヌナズナ SUP 遺伝子のタンパク質コード領域の 5' 側と 3' 側に相当する配列をもつオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成し、これらをプライマーとして、SUP 遺伝子を含む TAC ライブラリー K14B15 クローン（かずさ DNA 研究所より譲渡）を鋳型として、PCR を行い、SUP 遺伝子のコード領域を含む DNA 断片を単離した。全塩基配列を決定し、すでに報告されている SUP 遺伝子のコード領域であることを確認した。なお上記 PCR 反応の条件は、変性反応 94℃ 1 分、アニール反応 47℃ 2 分、伸長反応 74℃ 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクルおこなった。

(2) エフェクタープラスミドの構築 (SUP 遺伝子の全タンパク質コード領域を含むエフェクタープラスミド pGAL4DB-SUP の構築：図 1)

クローンテック社製 (Clontech 社, USA) のプラスミド pBI221 を制限酵素 XhoI と SacI で切断し、T4 ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動で GUS 遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター（以下 CaMV 35S）とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域（Nos ターミネーター、以下 Nos-ter）を含む 35S-Nos プラスミド断片 DNA を得た。

## 【0019】

クローンテック社製の pAS2-1 ベクターを制限酵素 HindIII で消化し、酵母における転写活性化因子である GAL4 タンパク質の DNA 結合領域（1-147 アミノ酸残基）をコードする 748 bp の DNA 断片（以下 GAL4DBD）をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をした。この GAL4DBD コード領域を含む DNA 断片を、先ほどの 35S-Nos の DNA の 35S プロモーターと Nos ターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35S プロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜して p35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

## 【0020】

GAL4DBD の読み枠（フレーム）が一致するように設計した SUP 遺伝子の 5 末アッ

パープライマー primer 1 (配列番号 3 : SUP遺伝子塩基配列1-18に結合) ;

GATGGAGAGATCAAACAGCと、

制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー primer 2 (配列番号 4 : SUP遺伝子塩基配列602-641に結合) ;

GATAAAGTTATTACCGTCGACTTAAGCGAAAC

を用いてSUP全タンパク質コード領域 (配列番号 1 : SUPタンパク質コード領域塩基配列 ; アミノ酸配列1-204) をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94℃ 1分、アニール反応℃47℃ 2分、伸長反応74℃ 1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このSUPをコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-SUPを構築した。

【 0 0 2 1 】

(3) SUPアミノ酸175-204を含むエフェクタープラスミドpGAL-175/204SUPの構築

GAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッププライマー primer 3 (配列番号 5 : 結合部位SUP塩基配列522-539) ;

GAATGATGAAATCATCAGと、

制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー primer 2 (配列番号 4 : 結合部位SUP塩基配列602-641) ;

GATAAAGTTATTACCGTCGACTTAAGCGAAAC

を用いてSUPのアミノ酸配列 175/204コード領域に該当する塩基配列522-641の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離し、塩基配列を決定した。このSUPのアミノ酸配列175/204をコードするDNA断片(DNA領域522-615)を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGALDB-175/204SUPを構築した。

【 0 0 2 2 】

## (4) 比較対照エフェクタープラスミドの構築 (図 2)

すでに報告され、転写活性化因子として知られているシロイヌナズナ AtERF5cDNA を含むクローン pAtERF5 を鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 4 (配列番号 6) ;

CATGGCGACTCCTAACGAAGTATCTGCAC と

3 末ローワープライマー primer 5 (配列番号 7) ;

ATCGTTCAAAACTCAAGGCTAACTAATCAACAACGGTC

を用いて AtERF5 全タンパク質コード領域を PCR 法によって増幅した。この DNA 断片を、上記に示した平滑末端にした 35S-Nos プラスミド断片に組み込み、エフェクタープラスミド p35S-AtERF5 を構築した。

また、これとは別に、SUP 遺伝子及び 175/204SUP を用いない他は上記手段と同様にしてエフェクタープラスミド pGAL4DB を構築した。

【 0 0 2 3 】

## 2. レポーター遺伝子の構築

リポーター遺伝子として、以下の手法により、35S-GAL4-LUC および GAL4-GCC-LUC の 2 種を構築した。

## (1) 35S-GAL4-LUC の構築 (図 3、4)

## a. GAL4-LUC の構築 (図 3)

プラスミド pUC18 を制限酵素 EcoRI と SstI で消化した。一方、pBI221 プラスミド (クローンテック社) を制限酵素 EcoRI と SstI で消化し、Nos-ter (nopaline synthase terminator) 領域を含む 270bp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって単離した。得られた断片を制限酵素 EcoRI と SstI で消化しておいたプラスミド pUC18 の EcoRI-SstI 部位に挿入した。次いで、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター TATA ボックスを含む相補鎖の DNA 1 (配列番号 8)

AGCTTAGATCTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACA

CGCTG と

DNA 2 (配列番号 9)

GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTA

を合成した。合成した DNA を 90℃ 2 分加熱した後、60℃ で 1 時間加熱し、その

後室温（25℃）で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させた。Nosを持つpUC18プラスミドを制限酵素 HindIII と BamHI で消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築した。

## 【0024】

このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理した。

一方、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクター PGV-CS 2（東洋インキ社製）を制限酵素XbaI とNcoIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUC リポーター遺伝子を構築した。

## 【0025】

さらに、酵母の GAL4 タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミド pG5CAT（Clontech社製）を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUC ベクターを制限酵素BgIIIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこう。この部位に平滑末端化した5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含むDNA断片を挿入し、得られたプラスミドのうち GAL4 タンパク質のDNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUC を構築した。

## 【0026】

## b. 35S-GAL4-LUCの構築（図4）

プラスミドpBI121を鋳型として、

5末アッパープライマー primer 6（配列番号10）；

CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACと

3末ローワープライマー primer 7（配列番号11）；

AAGGGTAAGCTTAAGGATAGTGGATTGTGCGTCATC

を用いてPCRをおこない、CaMV 35Sプロモーター-800~-46領域を含むDNA断片を得た。制限酵素HindIIIで消化した後、CaMV 35Sプロモーター-800~-46領域含む760bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって単離する。このHindIII断片を、あらかじめ制限酵素HindIIIで消化しておいたリポーター遺伝子GAL4-LUCに挿入し、CaMV 35Sプロモーター-DANが順方向に向いているものを選抜し、35S-GAL4-LUCリポーター遺伝子を構築した。

## 【 0 0 2 7 】

## (2) GAL4-GCC-LUCの構築 (図 5, 6)

4 個のGCC box配列 (AGCCGCC) を含む45bpDNAの相補鎖 (下記) を合成し、70℃で15分間加熱した後、室温で60分放置し、アニールさせ、2本鎖DNAとした。

5' -GATCAGCCGCCGATCAGCCGCCGATCAGCCGCCGATCAGCCGCC-3' (配列番号 1 2)

3' -TCGGCCGGCTAGTCGGCGGCTAGTCGGCGGCTAGTCGGCGGGATC-5' (配列番号 1 3)

この45bpのDNA断片を、制限酵素BglIIで予め消化しておいた上記のTATA-LUCベクターと1:1のモル数になるように混合し、T4リガーゼを用いてライゲーションをおこない、GCC bpxを含むDNA断片が順方向に入っているものを選択し、プラスミドGCC-LUCを構築した。

このプラスミドを制限酵素BglIIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理

をおこなう。

## 【 0 0 2 8 】

一方、酵母の GAL4 タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミド pG5CAT (Clontech社製) を 制限酵素SmaIと XbaIで消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーの GAL4タンパク質のDNA結合配列を含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。このDNA断片を、平滑末端処理をした、GCC-LUCプラスミドに挿入し、GAL4配列が順方向に入っているものを選択し、GAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子を構築した。

## 【 0 0 2 9 】

## (3) パーティクルガンによる遺伝子導入

pGAL4-LUCレポーター遺伝子1.6μg、エフェクタープラスミド として p

GALDB-SUP、あるいはそのデレーションであるpGALDB-175/204SUPのDNA1.2 $\mu$ g、比較対照プラスミドp35S-AtERF5あるいはpGAL4DB1.2 $\mu$ g、及びリファレンス遺伝子プラスミド0.32 $\mu$ gを直径1mmの金粒(BioRad社製)510 $\mu$ gにコーティングした。生育期間21日目のシロイヌナズナ葉7枚を、水でしめらせた濾紙をおいた9cmシャーレにならべ、Bio-Rad社製PDS-1000/Heボンバートメント機をもちいてDNAを打ち込んだ。次いで、22℃で6時間明所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

## 【0030】

## (4) ルシフェラーゼ活性測定

6時間静置したシロイヌナズナ葉を、液体窒素中で粉砕し、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている Passive Lysis Buffer 200  $\mu$ L に懸濁した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を 20  $\mu$ L をDual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている測定バッファー100  $\mu$ Lに混合し、ルミノメーター (TD20/20, Turner Design社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をレポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値であるRelative luciferase activityを測定値として求めた。実験は、エフェクタープラスミドの種類ごと3回個別にトランジェントアッセイ実験をおこない、平均値と標準偏差を求めた。エフェクターを入れない場合のp35S-GAL4-LUCレポーター遺伝子の活性の相対値を100、pGAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子の相対値を1として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにレポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。

## 【0031】

その結果を図7および8に示す。

なお、図7および8においてAはリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。これら図において、5XGAL4はGAL4転写因子DNA結合配列、TATAはCaMV35SプロモーターTATAボックスを含む領域、LUCはルシフェラーゼ遺伝子、

CaMV35Sはカリフラワーモザイクウイルス35Sタンパク質遺伝子プロモーター、GAL4DBは酵母GAL4転写因子DAN結合ドメインコード領域、Nosはノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域をそれぞれ表す。

#### 【0032】

BはSUPおよびSUPのディリーションがリポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす影響を示す図である。図において、左の数字(175/204等)は、SUPのアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。

#### 【0033】

図7の結果によれば、p35S-GAL4-LUCレポーター遺伝子とpGALDB-SUPエフェクタープラスミドを導入したときのリポーターの活性値が減少することから、pGALDB-SUPは、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果(リプレッサー機能)があることを示している。pGALDB-SUPエフェクターは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子の場合(コントロール)に比べ75%減少させた。対照実験としておこなったSUPのコード領域を含まないp35S-GALDBは、リポーター遺伝子の活性を低下さなかった。このことは、SUPが転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

また、SUP遺伝子のタンパク質コード領域をディリーションしたDAN断片をもつエフェクタープラスミドであるpGALDB-175/204SUPは、pGALDB-SUPを導入した場合よりもさらなる抑制効果を示し、レポーター遺伝子の活性を95%抑えるリプレッサー機能があることが示された。(図7; 175/204SUP)。

#### 【0034】

この結果から、SUPのリプレッサー機能を持つ領域(リプレッションドメイン)は、SUPのアミノ酸配列、175/204領域に存在することを明らかとなった。このアミノ酸配列を配列番号2に示した。

また、図8の結果によれば、GAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子と、転写活性化能を持つことが示されているp35S-ATERF5エフェクタープラスミドをシロイヌナズナ葉にパーティクルガンで導入しすると、リポーター遺伝子の活性は、エフェク



タープラスミドを導入しない場合（1とする）に比べ、15倍以上上昇した。リポーター遺伝子とp35S-AtERF5さらにpGAL4DB-SUPを同時に導入した場合、リポーター遺伝子の活性は、2.5倍程度にしか上昇しなかった。よって、このことは、SUPタンパク質は、AtERF5の転写活性化能を84%(1-2.5/15)抑制する効果を持つことを示している。さらに、SUPのディリーション領域を持つpGAL4DB-175/204SUPをGAL4-GCC-LUCリポーター遺伝子とpAtERF5エフェクターと同時に導入した場合、リポーター遺伝子の活性を90%抑制する効果を示した。p35S-AtERF5によるリポーター遺伝子の活性の上昇は、pGAL4DBを導入した場合には、影響されないことから、リポーター遺伝子の転写抑制効果は、SUPタンパク質の効果であることを示している。

【0035】

## 【実施例2】

SUPERMANリプレッションドメインをEIN3カルボキシル基側に付加したプラスミドによる、植物体におけるEIN3の転写活性化機能の抑制

### （1）形質転換用ベクターpBIG2の構築

クローンテック社製（Clontech社，USA）のプラスミドp35S-GFPを制限酵素HindIIIとBamHIで切断し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター

（CaMV 35S）を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクターpBIG-HYG（参考文献 Becker, D. 1990 Nucleic Acid Research18: 203）を制限酵素HindIIIとSstIで切断し、アガロースゲル電気泳動によってGUS遺伝子を除いたDNA断片を得る。

以下の配列を有するDNAを合成し、70℃で10分加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとする。このDNA断片には、5'末端にBamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、および制限酵素部位SmaI SalIを有する。

5'-GATCCACAATTACCAACAACAACAACAACAACAATTACAATTACAGATCCCGGGGGTACCGTCCGAGCTC-3'（配列番号14）

5'-CGTCGACGGTACCCCCGGGATCTGTAATTGTAATGTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGTYGGTAATTGT

G-3' (配列番号 15)

CaMV 35Sプロモーター領域をふくむDNA断片と合成した2本鎖DNAをGUS遺伝子を除いたpBIG-HYGのHindIII、SstI部位に挿入し、植物形質転換用ベクターpBIG2を得た。

【0036】

## (2) 形質転換ベクターpEIN3SUPRDの構築

米国ソーグ研究所から譲渡された、EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

5末アッパープライマー primer 8 (配列番号 16) ;

AATGATGTTTAATGAGATGGGと

3末ローワープライマー primer 9 (配列番号 17) ;

ATGAATCCCCGGGATATTATTCを用いて、EIN3のアミノ酸配列1-162コード領域に該当する塩基配列1-485の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素SmaIで切断した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。この断片を制限酵素SmaIで切断したpBIG2に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIGII-EIN3-1/162を得た。

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを制限酵素SmaIとPstIで切断し、アガロース電気泳動によってEIN3のアミノ酸配列163-565の領域をコードするDNA断片(486-1694)を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとPstIで切断しておいたクローニングベクターpBluescriptIIに挿入しプラスミドpEIN3-163-565を作成した。

【0037】

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

5末アッパープライマー primer 10 (配列番号 18) ;

CGACACTGCAGATCACAACと

3末端の終止コドンTAAをCCGに変換した、3末ローワープライマー primer 11 (配列番号 19) ;

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC

を用いてEIN3のアミノ酸配列566-628コード領域に該当する塩基配列1695-188

の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素Pst I で切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

先に述べた実施例 1 (3) と同様にアミノ酸の読み枠が一致するように作成しておいた、3' 末端に制限酵素SalI部位を有するSUPERMANのアミノ酸配列175/204コード領域に該当する塩基配列522-641の領域を含むDNA断片と、EIN3のアミノ酸配列566-628コード領域に該当する塩基配列1695-1888の領域を含むDNA断片を、制限酵素PstI、SalIで切断しておいた上記pEIN3-163 /565EIN3に挿入し、pEIN3-163/628-SupRDを作成した。

#### 【 0 0 3 8 】

プラスミドpEIN3-163/628-SupRDを、制限酵素SmaIとSalIで切断し、EIN3のアミノ酸配列163-628領域とSUPERMANの175/204の領域をコードするDNA断片を、アガロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、上記で述べたpBIG2-EIN3-1/162を制限酵素SmaIで切断したpBIG2-EIN3-1/162に挿入し、35S-EIN3-SupRD-Nosを含む形質転換ベクターpEIN3SUPRDを得た。

#### 【 0 0 3 9 】

##### (3) pEIN3SUPRDで形質転換した植物体の作成

pEIN3SUPRDによるシロイヌナズナ植物の形質転換は、Transformation of *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration (<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>) に従った。ただし、感染させるのにバキュウムは用いないで、浸すだけにした。プラスミドpEIN3RDを、土壌細菌 [ (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (C58C1Rifr) pMP90 (Gmr) (koncz and Schell 1986) ] 株にエレクトロポレーション法で導入した。

導入した菌を1リットルの下記のYEP培地でOD600が1になるまで培養した。

Y. EP medium ( 1 liter)	
10 g	Bacto. peptone
10 g	yeast extract
5g	NaCl

次いで、培養液から菌体を、回収し、1リットルの下記の感染用培地

(Infiltration medium) に懸濁した。

Infiltration medium ( 1 liter)	
2.29g	MS salt
50g	Sucrose
0.5g	MES
to pH.5.7 with KOH	
0.044	uM benzylaminopurine
0.2ml	Silwet L-77

#### 【0040】

この溶液に、14日間生育したシロイヌナズナを1分間浸し、感染させた後、再び生育させ結種させる。回収した種子を50%ブリーチ、0.02%Triton X-100溶液で7分間滅菌した後、滅菌水で3回リンスし、滅菌した下記のハイグロマイシン選択培地に蒔種する。

ハイグロマイシン選択培地	
4.3g/l	MSsalts
1%	sucrose
0.5g/l	MES
to pH5.7 with KOH	
0.8%	phytagar
30g/ml	Hygromicine
500ml	vancomycin

ハイグロマイシンプレートで生育する軽質転換植物体を選抜し、土壤に植え換え、次世代の種子を得た。

#### 【0041】

##### (4) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

得られた次世代 (T2) の軽質転換植物の種子を、エチレンの前駆体である1-aminocyclopropane-D-carboxylic acid (ACC) が最終濃度10uM添加され、滅菌さ

れた下記の生育培地を含む MSプレートに蒔種した。

MS プレート 生育培地	
4.3g/l	MSsalts
1%	sucrose
0.5g/l	MES
topH5.7	with KOHII
0.8%	phtager
ACC (final 10uM)	

#### 【0042】

これを、4℃で3日間低温処理した後、暗所22℃で3日間生育させ、定法に従って、エチレン応答を示す生理現象である、黄化芽生えでのトリプルレスポンス（3重応答）を観察した。結果を図9及び10に示す。

図9によれば、野生株である Col-0は、ACCの存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示すが、pEIN3SUPRDで形質転換した植物体（図9；EIN3-SupRD）では、EIN3の変異体であるein3植物体（図9；ein3-1）と同様に、茎長の屈曲および根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。また、図10によれば、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレンガス（100ppm、12時間）常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体（図10；Wild）になるが、pEIN3SUPRDで形質転換した植物体（図10；SUPRD）では、EIN3の変異体であるein3植物体（図10；ein3）よりもやや大きな植物体となり、ein3植物体よりもエチレン非感受性が高いein2植物体（図10；ein2）をエチレン存在下で生育させた植物と同様な大きさを示した。

#### 【0043】

さらに、野生型でエチレンで誘導されるが、エチレン非応答性の変異体であるein3植物体では、誘導されない遺伝子であるPDF1.2遺伝子、塩基性キチナーゼ（BCHN）遺伝子およびEthylene Responsive Factor1（ERF1）遺伝子の発現につい

て、野生型と pEIN3SUPRDで形質転換した植物体からRNAを精製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて調べた。

その結果、図11に示すように、エチレン処理（100ppMエチレンガス、12時間）した野生型（図11；Wild）では、PDF1.2、ERF1およびBCHN遺伝子の発現の誘導がみられた。

#### 【0044】

一方、pEIN3SUPRDで形質転換した植物体（図11；SUPRD）では、エチレン処理をおこなっても、ein3変異体（図11；ein3）植物同様PDF1.2、ERF1およびBCHN遺伝子の発現の誘導がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

以上の結果から、SUPERMAN の175-204 のアミノ酸配列を持つペプチドおよびそれをコードする遺伝子は、任意の転写因子を転写抑制因子に変換できる能力を有していることが明らかである。

#### 【0045】

##### 【参考例】

ERF3リプレッションドメインをEIN3カルボキシル基側に付加したプラスミドによる、植物体におけるEIN3の転写活性化機能の抑制

##### （1）形質転換用ベクターpBIGIIの構築

クローンテック社製（Clontech社，USA）のプラスミドp35S-GFPを制限酵素HindIIIとBamHIで切断し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（CaMV35S）を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

一方、米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクターPBI-HYG（参考文献 Becker' D. 1990 NucleicAcid Research18:203）を制限酵素HindIIIとSstIで切断し、アガロースゲル電気泳動によってGUS遺伝子を除いたDNA断片を得た。

#### 【0046】

次いで、以下の配列を有するDNAを合成し、70℃で10分加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。このDNA断片には、5'末端にBamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、および制限酵素部位SmaI、SalI、SstIを有する。

5'-GATCCACAATACCAACAACAACAACAACAACATTACAATTACAGATCCCGGGGGTACCGTCGAC  
GAGCTC-3' (配列番号 1 4)

5'-CGTCGACGGTACCCCCGGGATCTGTAATTGTAATGTTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGYGGTAATTGT  
G-3' (配列番号 1 5)

CaMV35SSプロモーター領域をふくむDNA断片と合成した2本鎖DNAをGUS遺伝子を除いたpBIG-HYGのHindIII、SstI部位に挿入し、植物形質転換用ベクターpBIG2を完成させた。

【 0 0 4 7 】

## (2) 形質転換ベクターpEIN3RDの構築

米国ソーグ研究所から譲渡された、EIN3 cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

5末アッパープライマー primer 8 (配列番号 1 6) ;

AATGATGTTTAATGAGATGGG と、

3末ローワープライマー primer 9 (配列番号 1 7) ;

ATGAATCCCCGGGATATTATTC

を用いてEIN3のアミノ酸配列1-162コード領域に該当する塩基配列1-485の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素SmaIで切断した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。この断片を、制限酵素SmaIで切断したpBIG2に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIGII-EIN3-1/162を得た。

【 0 0 4 8 】

PCR反応の条件は、変性反応94℃1分、アニール反応℃47℃2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとしてで25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを制限酵素SmaIとPstIで切断し、アガロース電気泳動によってEIN3のアミノ酸配列163-565の領域をコードするDNA断片(486-1694)を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとPstIで切断しておいたクローニングベクターpBluescriptIIに挿入しプラスミドpEIN3-163-565を作成した。

EIN3cDNAの全長を含むpEIN3クローンを鋳型として、

5末アッパープライマー primer 10 (配列番号18) ;

CGACACTGCAGATCACAACと、

3末端の終止コドンTAAをCCCに変換した3末ローワープライマー primer 11 (配列番号19) ;

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC

を用いてEIN3のアミノ酸配列566-628コード領域に該当する塩基配列1695-1888の領域を含むDNA断片をPCR法によって増幅し、制限酵素Pst Iで切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

#### 【0049】

3'末端に制限酵素Sal I部位を有するERF3のアミノ酸配列191-225をコードする領域に相当する塩基配列569-678の領域のDNA断片を、EIN3のカルボキシル基末端とフレームと読み枠が一致するように設計した。なお、ERF3の全長遺伝子の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号26に示す。

5末アッパープライマー primer 12 (配列番号20 ; 結合部位ERF3塩基配列569-593) ;

AGTGGGTCCTACTGTGTCGGACTCと

制限酵素Sal I部位を持つ3末ローワープライマー primer 13 (配列番号21 ; 結合部位ERF3塩基配列661-678) ;

CCAAATAACATTATCGGTCGACTCAAAATTCCATAGGTG

を用いてERF3のアミノ酸配列191/225コード領域に該当する塩基配列569-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素sal Iで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。

このERF3のリプレッションドメインをコードするDNA断片と、EIN3のアミノ酸配列566-628をコードする塩基配列1695-1888のDNA断片を、制限酵素Pst I - Sal Iで切断しておいた上記pEIN3-163/565EIN3に挿入し、pEIN3-163/628-RDを作成した。

#### 【0050】

プラスミドpEIN3-163/628-RDを、制限酵素Sma I とSal Iで切断し、EIN3のア



ミノ酸配列163-628領域とERF3の191-225の領域をコードするDNA断片を、アガロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、上記で述べたpBIG2-EIN3-1/162を制限酵素smaIで切断したpBIG2-EIN3-1/162に挿入し、35S-EIN3-RD-Nosを含む形質転換ベクターpEIN3RDを完成させた。

## 【 0 0 5 1 】

## (3) 比較対象形質転換ベクターの構築

上記と同じ方法で、下記配列のERF3の191-225のリプレッションドメインの215と217番目のアスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異ドメインを持つRD<sub>m</sub>をコードするDNA断片を挿入しpEIN3RD<sub>m</sub>を完成させた。 VGPTVSDSSSAVEENQYDGKR DIALALNLAPMEF (配列番号22)

アラニン置換した変異ドメインをコードするDNAは、以下の両ストランドを合成した。

5'-AGTGGGTCCTACTGTGTGCGGACTCGTCCTCTGCAGTGGAAGAGAACCAATATGATGGGGAAAAGAGGAA TTGATCTTGATCTTAACCTTGCTCGACCTATGGAATTTTGAG-3' (配列番号23)

5'-TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGATCAATTCCTCTTTTCCCCCATCATATT GGTCTCTTCCACTGCAGAGGACGAGTCCGACACAGTAGGACCCACT-3' (配列番号24)

## 【 0 0 5 2 】

## (4) pEIN3RDで形質転換した植物体の作成

実施例2(3)と全く同様にして、形質転換ベクターpEIN3PRDおよびpEIN3RD<sub>m</sub>比較対象形質転換ベクターを用いてシロイヌナズナ植物の形質転換を行い、さらにハイグロマイシンプレートで選抜し、次世代の種子を得た。

## 【 0 0 5 3 】

## (5) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

得られた次世代(T2)形質転換植物の種子を、実施例(5)と同様にして生育させ、エチレン応答を示す生理現象である、黄化芽生えでのトリプルレスポンス(3重応答)を観察した。同一条件下で野生株Col-0およびEIN3の変異体であるein3植物体のエチレン応答性も観察した。結果を図10及び12に示す。

## 【 0 0 5 4 】

図 1 2 によれば、野生株である Col-0 は、ACC の存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示す。また、ERF3 の 191-225 のリプレッションドメインの 215 と 217 番目のアスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異ドメインを持つ RDm を有する pEIN3-RDm で形質転換された植物体 (図 1 2 ; EIN3-RDm) も、上記野生株 Col-0 と同様のエチレン応答性を示す。これに対して、pEIN3RD で形質転換された植物体 (図 1 2 ; EIN3-RD) では、EIN3 の変異体である ein3 植物体 (図 1 2 ; ein3-1) と同様に、茎長の屈曲および根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

## 【 0 0 5 5 】

また、図 1 0 によれば、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレン (100ppm 1 2 時間) 常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体 (図 1 0 ; Wild) になるが、pEIN3RD で形質転換した植物体 (図 1 0 ; RD) では、EIN3 の変異体である ein 植物体 (図 1 0 ; ein3 ; ) とほとんど変わらない大きさを示した。

さらに、野生型でエチレンで誘導されるが、エチレン非応答性の変異体である ein3 植物体では、誘導されない遺伝子である PDF1.2 遺伝子、塩基性キチナーゼ (BCHN) 遺伝子および Ethylen Responsive Factor1 (ERF-1) 遺伝子の発現について、野生型と pEIN3RD で形質転換した植物体から RNA を精製し、ノーザンプロットハイブリダイゼーション法を用いて調べた。

## 【 0 0 5 6 】

その結果、図 1 1 に示すように、エチレン処理 (100ppM エチレンガス、12 時間) した野生型 (図 1 1 ; Wild) では、PDF1.2、ERF-1 および BCHN 遺伝子の発現の誘導がみられる。一方、pEIN3RD で形質転換した植物体 (図 1 1 ; RD) では、エチレン処理をおこなっても、ein3 変異体植物 (図 1 1 ; ein3) 同様 PDF1.2、ERF1 および BCHN 遺伝子の発現の誘導がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

以上の結果から、ERF3 の 191-205 のアミノ酸配列を持つペプチドおよびそれをコードする遺伝子は、任意の転写活性化因子を転写抑制因子に変換できる能力を持つ。

## 【 0 0 5 7 】

## 【発明の効果】

本発明の遺伝子の転写抑制手段は極めて簡便、かつ効率的なものであって、しかも生物の種を越えた極めて普遍的なものであり、例えばガン遺伝子等の疾病遺伝子の転写抑制による治療、あるいはアレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制してアレルゲンのない食用作物の創生、さらには有害遺伝子の発現抑制に基づく非食用作物の食用化、色素代謝系の遺伝子の発現を抑制することによる今までにない花の色を有する植物の創生等、極めて広い分野に応用可能な極めて有用なものである。

【 0 0 5 8 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

&lt;120&gt; 転写抑制ペプチド及びその遺伝子

&lt;130&gt; 220-01328

&lt;160&gt; 26

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 615

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopdis thaliana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) (615)

&lt;223&gt;

&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Sakai, H., Medrano, L.J. and Meyerowitz, E.M.

<302> Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries

<303> Nature

<304> 378

<305> 6553

<306> 199-203

<307> 1995

<308> U38946

<400> 1

atg gag aga tca aac agc ata gag ttg agg aac agc ttc tat ggc cgt 48

Met Glu Arg Ser Asn Ser Ile Glu Leu Arg Asn Ser Phe Tyr Gly Arg

1

5

10

15

gca aga act tca cca tgg agc tat gga gat tat gat aat tgc caa cag 96

Ala Arg Thr Ser Pro Trp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Asn Cys Gln Gln

20

25

30

gat cat gat tat ctt cta ggg ttt tca tgg cca cca aga tcc tac act 144

Asp His Asp Tyr Leu Leu Gly Phe Ser Trp Pro Pro Arg Ser Tyr Thr

35

40

45

tgc agc ttc tgc aaa agg gaa ttc aga tcg gct caa gca ctt ggt ggc 192

Cys Ser Phe Cys Lys Arg Glu Phe Arg Ser Ala Gln Ala Leu Gly Gly

50

55

60

cac atg aat gtt cac aga aga gac aga gca aga ctc aga tta caa cag 240

His Met Asn Val His Arg Arg Asp Arg Ala Arg Leu Arg Leu Gln Gln

65

70

75

80

tct cca tca tca tct tca aca cct tct cct cct tac cct aac cct aat 248

Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Pro Ser Pro Pro Tyr Pro Asn Pro Asn

85

90

95

tac tct tac tca acc atg gca aac tct cct cct cct cat cat tct cct 296

Tyr Ser Tyr Ser Thr Met Ala Asn Ser Pro Pro Pro His His Ser Pro

100

105

110

cta acc cta ttt cca acc ctt tct cct cca tcc tca cca aga tat agg 344

Leu Thr Leu Phe Pro Thr Leu Ser Pro Pro Ser Ser Pro Arg Tyr Arg

115

120

125

gca ggt ttg atc cgt tcc ttg agc ccc aag tca aaa cat aca cca gaa 392

Ala Gly Leu Ile Arg Ser Leu Ser Pro Lys Ser Lys His Thr Pro Glu

130

135

140

aac gct tgt aag act aag aaa tca tct ctt tta gtg gag gct gga gag 440

Asn Ala Cys Lys Thr Lys Lys Ser Ser Leu Leu Val Glu Ala Gly Glu

145

150

155

160

gct aca agg ttc acc agt aaa gat gct tgc aag atc ctg agg aat gat 488

Ala Thr Arg Phe Thr Ser Lys Asp Ala Cys Lys Ile Leu Arg Asn Asp

165

170

175

gaa atc atc agc ttg gag ctt gag att ggt ttg att aac gaa tca gag 582

Glu Ile Ile Ser Leu Glu Leu Glu Ile Gly Leu Ile Asn Glu Ser Glu

180

185

190

caa gat ctg gat cta gaa ctc cgt ttg ggt ttc gct taa 611

Leu Gly Phe Ala Gln Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg

195

200

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 2

Asn Asp Glu Ile Ile Ser Leu Glu Leu Glu Ile Gly Leu Ile Asn Glu

1

5

10

15

Ser Glu Gln Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala

20

25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 3

gatggagaga tcaaacagc

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 4

gataaagtta ttaccgtcga cttagcgaa ac

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 5

gaatgatgaa atcatcag

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 6

catggcgact cctaacgaag tatctgcac

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

atcgttcaaa aactcaaggc taactaatca acaacggtc

<210> 8

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 8

agcttagatc tgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca 60  
cgctg

<210> 9

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 9

gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgcag 60  
atcta

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 10

cgccagggtt ttcccagtca cgac

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 11

aagggttaagc ttaaggatag tgggattgtg cgtcac

<210> 12

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 12

gatcagccgc cgatcagccg ccgatcagcc gccgatcagc cgcc

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 13

tcggccggct agtcggcggc tagtcggcgg ctagtcggcg ggatc

<210> 14

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 14

gatccacaat taccaacaac aacaacaac aaacaacatt acaattacag atcccggggg 60

taccgtcgac gagctc



<210> 15

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 15

cgtcgacggg acccccgga tctgtaattg taatgttggt tgttggtgtg tgttggtgtg 60  
ggtaattgtg

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

aatgatgttt aatgagatgg g

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

atgaatcccc ggatattat tc

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

cgacactgca gatcacaac

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 19

atcccgaacc atatggatac atcttgctgc

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 20

agtgggtcct actgtgtcgg actc

<211> 21

<212> 39

<213> DNA

<400> 21

ccaaataaca ttatcggtcg actcaaaatt ccataggtg

<210> 22

<211>35

<212>PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 22

Val Gly Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn

1

5

10

15

Gly Tyr Asp Gly Lys Arg Asp Ile Ala Leu Ala Lue Asn Lue Ala

20

25

30

Pro Pro Met Glu Phe

35

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

&lt;400&gt; 23

agtgggtcct actgtgtcgg actcgtcctc tgcagtggaa gagaaccaat atgatgggga 60  
 aaagaggaat tgatcttgat cttaaccttg ctccacctat ggaattttga g

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

&lt;400&gt; 24

tcgactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gatcaattcc tcttttcccc 60  
 catcatattg gttctcttcc actgcagagg acgagtccga cacagtagga cccact

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1887

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) (1887)

&lt;223&gt;

&lt;300&gt;

&lt;301&gt;

Chao,Q., Rothenberg,M., Solano,R., Roman,G., Terzaghi,W. and Ecker,J.R.

&lt;302&gt;

Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins

&lt;303&gt; Cell

&lt;304&gt; 89

&lt;305&gt; (7)

&lt;306&gt; 1133-1144

&lt;307&gt; (1997)

&lt;308&gt; AF004216

&lt;400&gt; 25

atg atg ttt aat gag atg gga atg tgt gga aac atg gat ttc ttc tct 48

Met Met Phe Asn Glu Met Gly Met Cys Gly Asn Met Asp Phe Phe Ser

1

5

10

15

tct gga tca ctt ggt gaa gtt gat ttc tgt cct gtt cca caa gct gag 96

Ser Gly Ser Leu Gly Glu Val Asp Phe Cys Pro Val Pro Gln Ala Glu

20

25

30

cct gat tcc att gtt gaa gat gac tat act gat gat gag att gat gtt 144

Pro Asp Ser Ile Val Glu Asp Asp Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Asp Val

35

40

45

gat gaa ttg gag agg agg atg tgg aga gac aaa atg cgg ctt aaa cgt 192

Asp Glu Leu Glu Arg Arg Met Trp Arg Asp Lys Met Arg Leu Lys Arg

50

55

60

ctc aag gag cag gat aag ggt aaa gaa ggt gtt gat gct gct aaa cag 240

Leu Lys Glu Gln Asp Lys Gly Lys Glu Gly Val Asp Ala Ala Lys Gln

65

70

75

80

agg cag tct caa gag caa gct agg agg aag aaa atg tct aga gct caa 288

Arg Gln Ser Gln Glu Gln Ala Arg Arg Lys Lys Met Ser Arg Ala Gln

85

90

95

gat ggg atc ttg aag tat atg ttg aag atg atg gaa gtt tgt aaa gct 336

Asp Gly Ile Leu Lys Tyr Met Leu Lys Met Met Glu Val Cys Lys Ala

100

105

110

caa ggc ttt gtt tat ggg att att ccg gag aat ggg aag cct gtg act 384

Gln Gly Phe Val Tyr Gly Ile Ile Pro Glu Asn Gly Lys Pro Val Thr

115

120

125

ggt gct tct gat aat tta agg gag tgg tgg aaa gat aag gtt agg ttt 432

Gly Ala Ser Asp Asn Leu Arg Glu Trp Trp Lys Asp Lys Val Arg Phe

130

135

140

gat cgt aat ggt cct gcg gct att acc aag tat caa gcg gag aat aat 480

Asp Arg Asn Gly Pro Ala Ala Ile Thr Lys Tyr Gln Ala Glu Asn Asn

145

150

155

160

atc ccg ggg att cat gaa ggt aat aac ccg att gga ccg act cct cat 528

Ile Pro Gly Ile His Glu Gly Asn Asn Pro Ile Gly Pro Thr Pro His

165

170

175

acc ttg caa gag ctt caa gac acg act ctt gga tcg ctt ttg tct gcg 576

Thr Leu Gln Glu Leu Gln Asp Thr Thr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ala

180

185

190

ttg atg caa cac tgt gat cct cct cag aga cgt ttt cct ttg gag aaa 624

Leu Met Gln His Cys Asp Pro Pro Gln Arg Arg Phe Pro Leu Glu Lys

195

200

205

gga gtt cct cct ccg tgg tgg cct aat ggg aaa gag gat tgg tgg cct 672

Gly Val Pro Pro Pro Trp Trp Pro Asn Gly Lys Glu Asp Trp Trp Pro

210

215

220

caa ctt ggt ttg cct aaa gat caa ggt cct gca cct tac aag aag cct 720

Gln Leu Gly Leu Pro Lys Asp Gln Gly Pro Ala Pro Tyr Lys Lys Pro

225

230

235

240

cat gat ttg aag aag gcg tgg aaa gtc ggc gtt ttg act gcg gtt atc 768

His Asp Leu Lys Lys Ala Trp Lys Val Gly Val Leu Thr Ala Val Ile  
 245 250 255  
 aag cat atg ttt cct gat att gct aag atc cgt aag ctc gtg agg caa 816  
 Lys His Met Phe Pro Asp Ile Ala Lys Ile Arg Lys Leu Val Arg Gln  
 260 265 270  
 tct aaa tgt ttg cag gat aag atg act gct aaa gag agt gct acc tgg 864  
 Ser Lys Cys Leu Gln Asp Lys Met Thr Ala Lys Glu Ser Ala Thr Trp  
 275 280 285  
 ctt gct att att aac caa gaa gag tcc ttg gct aga gag ctt tat ccc 912  
 Leu Ala Ile Ile Asn Gln Glu Glu Ser Leu Ala Arg Glu Leu Tyr Pro  
 290 295 300  
 gag tca tgt cca cct ctt tct ctg tct ggt gga agt tgc tcg ctt ctg 960  
 Glu Ser Cys Pro Pro Leu Ser Leu Ser Gly Gly Ser Cys Ser Leu Leu  
 305 310 315 320  
 atg aat gat tgc agt caa tac gat gtt gaa ggt ttc gag aag gag tct 1008  
 Met Asn Asp Cys Ser Gln Tyr Asp Val Glu Gly Phe Glu Lys Glu Ser  
 325 330 335  
 cac tat gaa gtg gaa gag ctc aag cca gaa aaa gtt atg aat tct tca 1056  
 His Tyr Glu Val Glu Glu Leu Lys Pro Glu Lys Val Met Asn Ser Ser  
 340 345 350  
 aac ttt ggg atg gtt gct aaa atg cat gac ttt cct gtc aaa gaa gaa 1104  
 Asn Phe Gly Met Val Ala Lys Met His Asp Phe Pro Val Lys Glu Glu  
 355 360 365  
 gtc cca gca gga aac tcg gaa ttc atg aga aag aga aag cca aac aga 1152  
 Val Pro Ala Gly Asn Ser Glu Phe Met Arg Lys Arg Lys Pro Asn Arg  
 370 375 380  
 gat ctg aac act att atg gac aga acc gtt ttc acc tgc gag aat ctt 1200  
 Asp Leu Asn Thr Ile Met Asp Arg Thr Val Phe Thr Cys Glu Asn Leu  
 385 390 395 400

ggg tgt gcg cac agc gaa atc agc cgg gga ttt ctg gat agg aat tcg 1248  
Gly Cys Ala His Ser Glu Ile Ser Arg Gly Phe Leu Asp Arg Asn Ser

405

410

415

aga gac aac cat caa ctg gca tgt cca cat cga gac agt cgc tta ccg 1296  
Arg Asp Asn His Gln Leu Ala Cys Pro His Arg Asp Ser Arg Leu Pro

420

425

430

tat gga gca gca cca tcc agg ttt cat gtc aat gaa gtt aag cct gta 1344  
Tyr Gly Ala Ala Pro Ser Arg Phe His Val Asn Glu Val Lys Pro Val

435

440

445

gtt gga ttt cct cag cca agg cca gtg aac tca gta gcc caa cca att 1392  
Val Gly Phe Pro Gln Pro Arg Pro Val Asn Ser Val Ala Gln Pro Ile

450

455

460

gac tta acg ggt ata gtt cct gaa gat gga cag aag atg atc tca gag 1440  
Asp Leu Thr Gly Ile Val Pro Glu Asp Gly Gln Lys Met Ile Ser Glu

465

470

475

480

ctc atg tcc atg tac gac aga aat gtc cag agc aac caa acc tct atg 1488  
Leu Met Ser Met Tyr Asp Arg Asn Val Gln Ser Asn Gln Thr Ser Met

485

490

495

gtc atg gaa aat caa agc gtg tca ctg ctt caa ccc aca gtc cat aac 1536  
Val Met Glu Asn Gln Ser Val Ser Leu Leu Gln Pro Thr Val His Asn

500

505

510

cat caa gaa cat ctc cag ttc cca gga aac atg gtg gaa gga agt ttc 1584  
His Gln Glu His Leu Gln Phe Pro Gly Asn Met Val Glu Gly Ser Phe

515

520

525

ttt gaa gac ttg aac atc cca aac aga gca aac aac aac aac agc agc 1632  
Phe Glu Asp Leu Asn Ile Pro Asn Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ser Ser

530

535

540

aac aat caa acg ttt ttt caa ggg aac aac aac aac aac aat gtg ttt 1696  
Asn Asn Gln Thr Phe Phe Gln Gly Asn Asn Asn Asn Asn Asn Val Phe

545                      550                      555                      560

aag ttc gac act gca gat cac aac aac ttt gaa gct gca cat aac aac 1728

Lys Phe Asp Thr Ala Asp His Asn Asn Phe Glu Ala Ala His Asn Asn

565 570 575

aac aat aac agt agc ggc aac agg ttc cag ctt gtg ttt gat tcc aca 1776

Asn Asn Asn Ser Ser Gly Asn Arg Phe Gln Leu Val Phe Asp Ser Thr

**580**

ccg ttc gac atg gcg tca ttc gat tac aga gat gat atg tcg atg cca 1824

Pro Phe Asp Met Ala Ser Phe Asp Tyr Arg Asp Asp Met Ser Met Pro

595                      600                      605

**gga gta gta gga acg atg gat gga atg cag cag aag cag caa gat gta 1872**

Gly Val Val Gly Thr Met Asp Gly Met Gln Gln Lys Gln Gln Asp Val

610                      615                      620

tcc ata tgg ttc taa

1887

Ser Ile Trp Phe

625

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 678

&lt;212&gt; DNA, PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

**<220>**

<221> CDS

$\langle 222 \rangle$  (1) (678)

<223>

<300>

<301> Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H.

<302>



Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element

<303> Plant Cell

<304> 7

<305> (2)

<306> 173-182

<307> 1995

<308> D38124

<400> 26

atg gct gtc aaa aat aag gtt agt aat ggc aat ctg aaa gga gga aat 48

Met Ala Val Lys Asn Lys Val Ser Asn Gly Asn Leu Lys Gly Gly Asn

1 5 10 15

gtg aaa aca gat gga gtt aag gag gtt cac tac aga ggt gta agg aag 96

Val Lys Thr Asp Gly Val Lys Glu Val His Tyr Arg Gly Val Arg Lys

20 25 30

agg cca tgg ggt cgg tat gca gct gaa atc cgt gac ccg ggt aag aag 144

Arg Pro Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Gly Lys Lys

35 40 45

agt cgg gtc tgg tta ggt act ttc gac acg gcg gaa gag gcg gct aag 192

Ser Arg Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ala Ala Lys

50 55 60

gcg tac gac acc gcc gct cga gag ttt cgt gga ccc aaa gca aaa act 240

Ala Tyr Asp Thr Ala Ala Arg Glu Phe Arg Gly Pro Lys Ala Lys Thr

65 70 75 80

aac ttc cct tca ccg acg gag aat cag agc cca agt cac agc agc acc 288

Asn Phe Pro Ser Pro Thr Glu Asn Gln Ser Pro Ser His Ser Ser Thr

85 90 95

gtg gag tcc tct agt gga gag aat ggt gtt cac gcg ccg cct cat gcg 336

Val Glu Ser Ser Ser Gly Glu Asn Gly Val His Ala Pro Pro His Ala

100 105 110  
 ccg ctc gag ctg gat ctc acg cgc cgt ctt ggc tcc gtt gct gca<sup>6</sup> gat 384  
 Pro Leu Glu Leu Asp Leu Thr Arg Arg Leu Gly Ser Val Ala Ala Asp  
 115 120 125  
 ggc ggt gac aac tgt cgc cgt tct ggg gaa gtt ggg tac ccg att ttc 432  
 Gly Gly Asp Asn Cys Arg Arg Ser Gly Glu Val Gly Tyr Pro Ile Phe  
 130 135 140  
 cac cag cag ccg act gtg gcg gtt ctg cca aat ggc cag ccg gtt ctg 480  
 His Gln Gln Pro Thr Val Ala Val Leu Pro Asn Gly Gln Pro Val Leu  
 145 150 155 160  
 ctc ttt gat tct ttg tgg cgg gcg gga gtt gtt aac agg cct cag cct 528  
 Leu Phe Asp Ser Leu Trp Arg Ala Gly Val Val Asn Arg Pro Gln Pro  
 165 170 175  
 tac cat gta acg ccg atg ggg ttt aac ggc gtt aac gcc gga gtg ggt 576  
 Tyr His Val Thr Pro Met Gly Phe Asn Gly Val Asn Ala Gly Val Gly  
 180 185 190  
 cct act gtg tcg gac tcg tcc tct gca gtg gaa gag aac caa tat gat 624  
 Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn Gln Tyr Asp  
 195 200 205  
 ggg aaa aga gga att gat ctt gat ctt aac ctt gct cca cct atg gaa 672  
 Gly Lys Arg Gly Ile Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu  
 210 220 225  
 ttt tga 678  
 Phe

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 エフェクタープラスミド pGALDB-SUP の構築手順を示す図である。

【図 2】 エフェクタープラスミド p-AtERF5 の構築手順を示す図である。

【図 3】 レポータープラスミド p35S-GAL4-LUC の構築手順の前半部を示す図である。

【図 4】 レポータープラスミド p35S-GAL4-LUC の構築手順の後半部を示す図である。

【図 5】 レポータープラスミド pGAL4-GCC-LUC の構築手順の前半部を示す図である。

【図 6】 レポータープラスミド pGAL4-GCC-LUC の構築手順の後半部を示す図である。

【図 7】 A は、転写抑制試験において、レポーターとしてプラスミドに組み込まれた 35S-GAL4-LUC の構造及び同エフェクター遺伝子として組み込まれた SUP(D) の構造の概略を示す図であり、B は SUP 遺伝子及びその断片等による 転写抑制試験の結果を示す図である。

【図 8】 A は、転写抑制試験において、レポーターとして使用した GAL4-GCC-LUC の構造、及び AtERF5、GAL4DB、SUPfull、SUP175/204 を組み込んで構築されたエフェクター遺伝子の構造の概略を示す図であり、B は各エフェクターによる転写抑制試験の結果を示す図である。

【図 9】 SUP 遺伝子による EIN3 の転写活性化機能の抑制効果を、エチレン前駆体存在下における植物体の茎長、根の伸長程度により調べた結果を示す写真である。

【図 10】 SUP 遺伝子及び ERF3 遺伝子による植物体における EIN3 の転写活性化機能の抑制効果をエチレン存在下における植物体成長の程度により調べた結果を示す写真である。

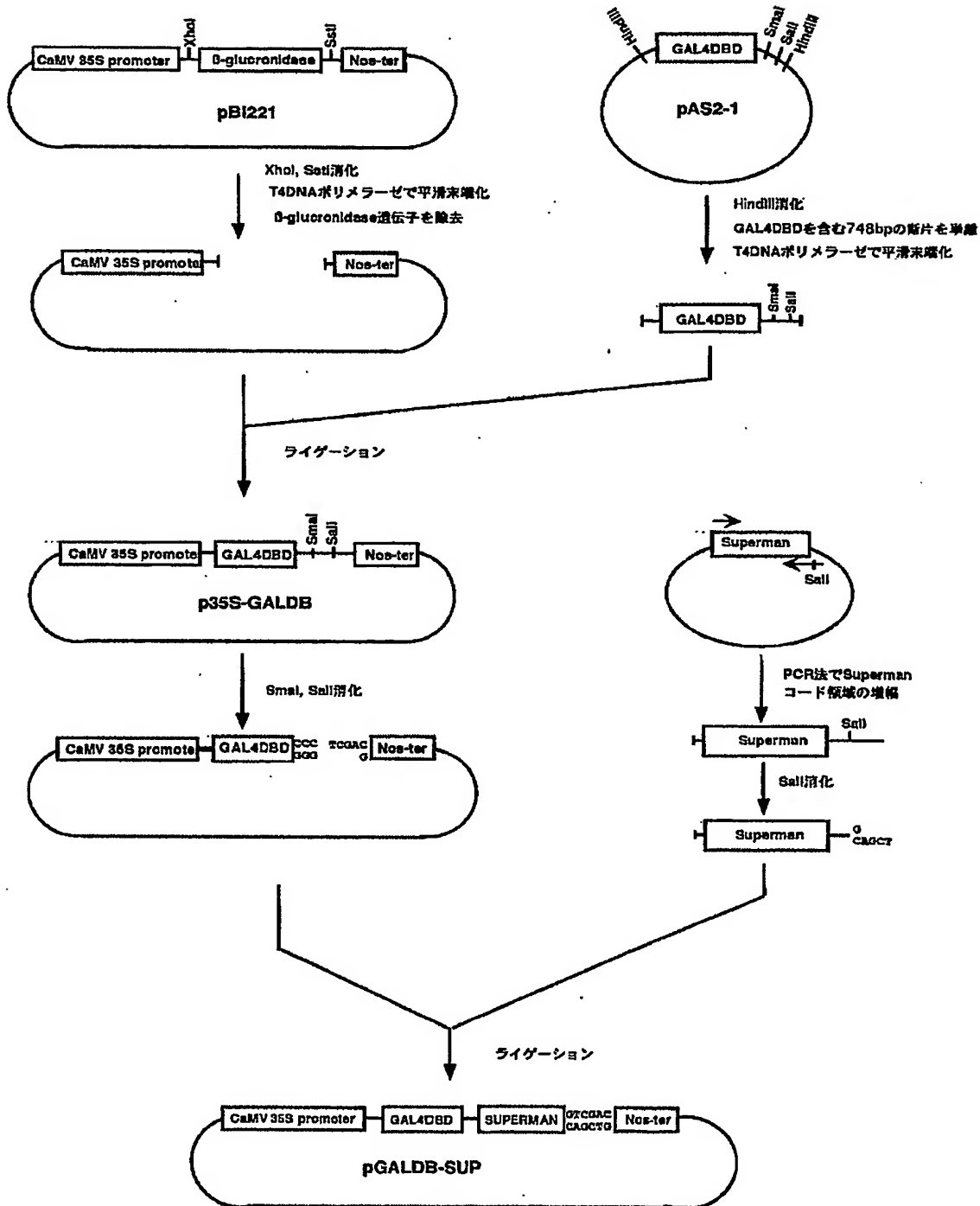
【図 11】 SUP 遺伝子及び ERF3 遺伝子による、エチレン存在下での PDF1.2、BCHN 及び ERF1 遺伝子の発現抑制効果を、これらエチレン誘導性遺伝子の発現を示す mRNA の検出の有無を指標にノーザンプロットハイブリダイゼーションにより調べた結果を示す写真である。

【図 12】 ERF3 遺伝子による EIN3 の転写活性化機能の抑制効果を、エチレン前駆体存在下における植物体の茎長、根の伸長程度により調べた結果を示す写真である。

【書類名】 図面

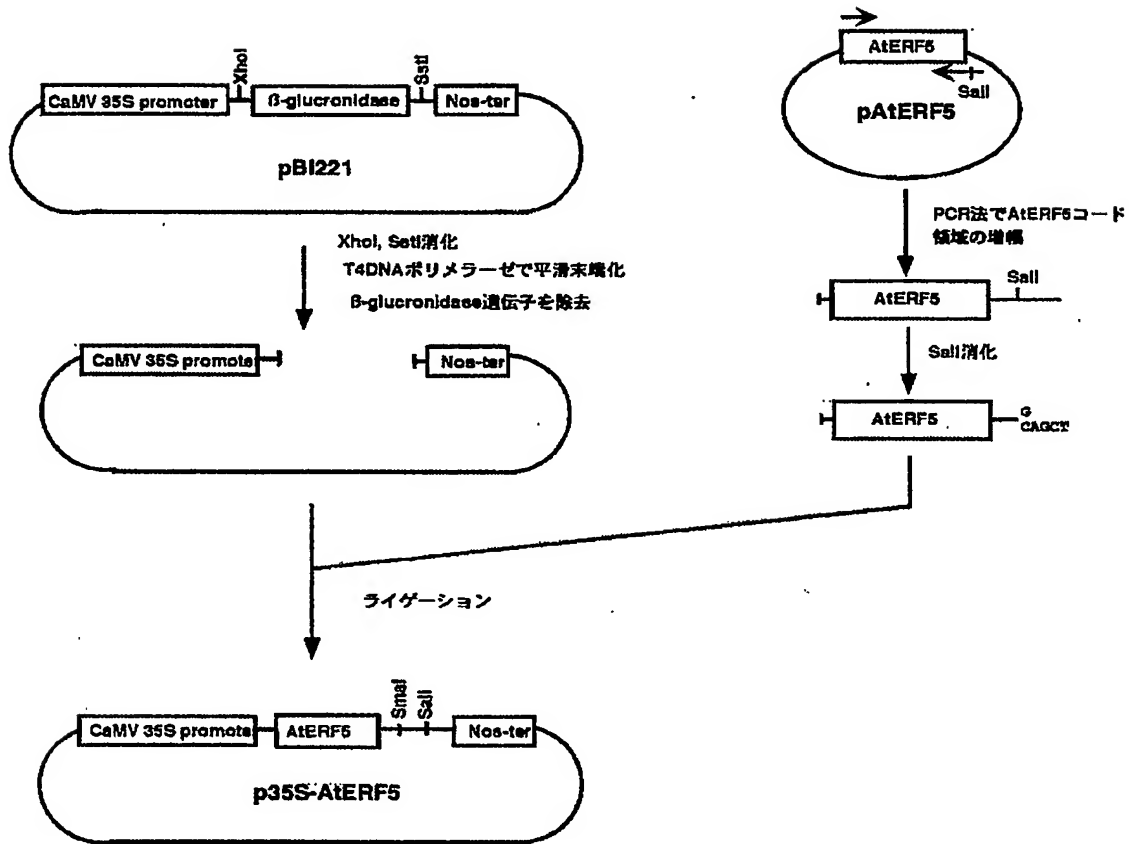
【図 1】

エフェクタープラスミドの構築

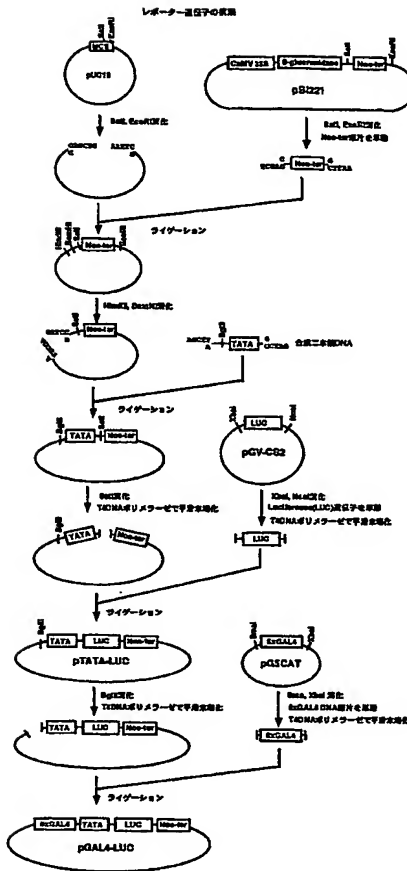


【図 2】

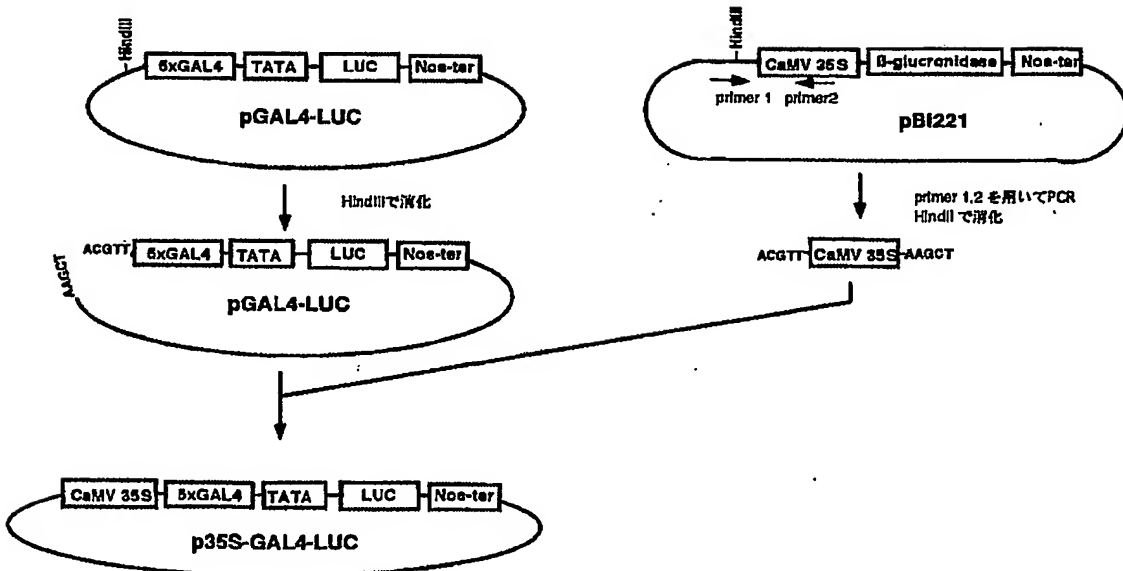
エフェクタープラスミドの構築



【図 3】

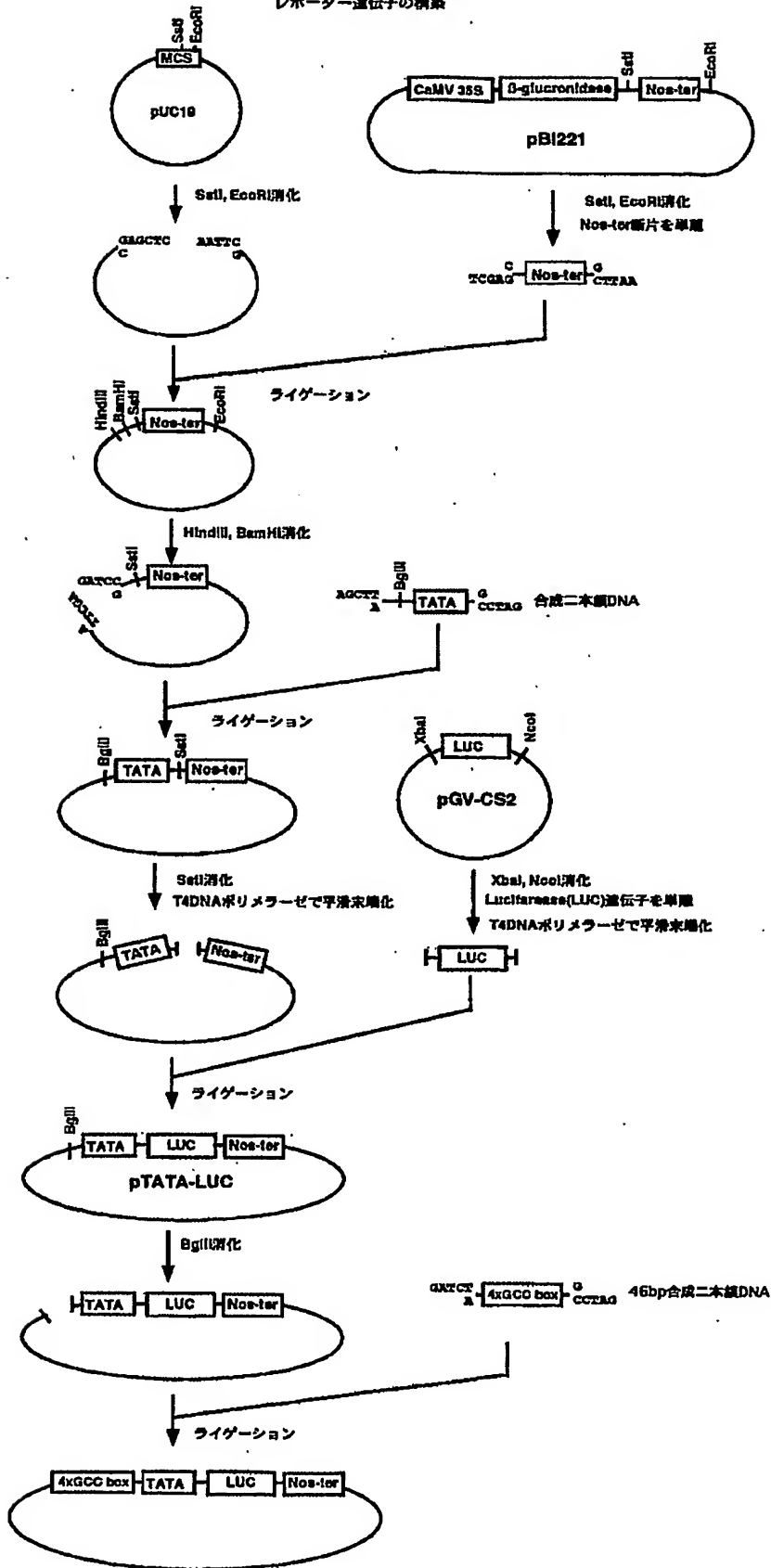


【図 4】

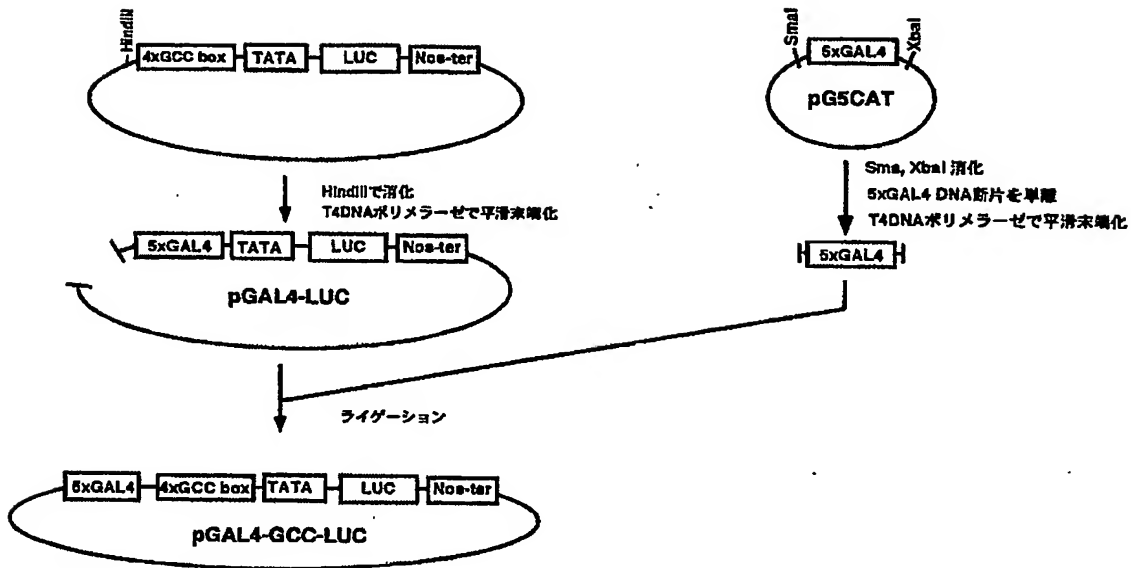


【図 5】

レポーター遺伝子の構築

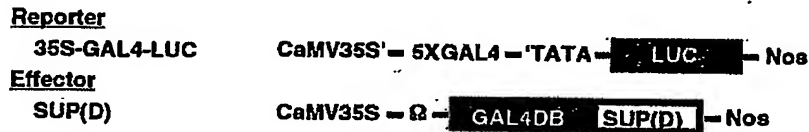


【図 6】

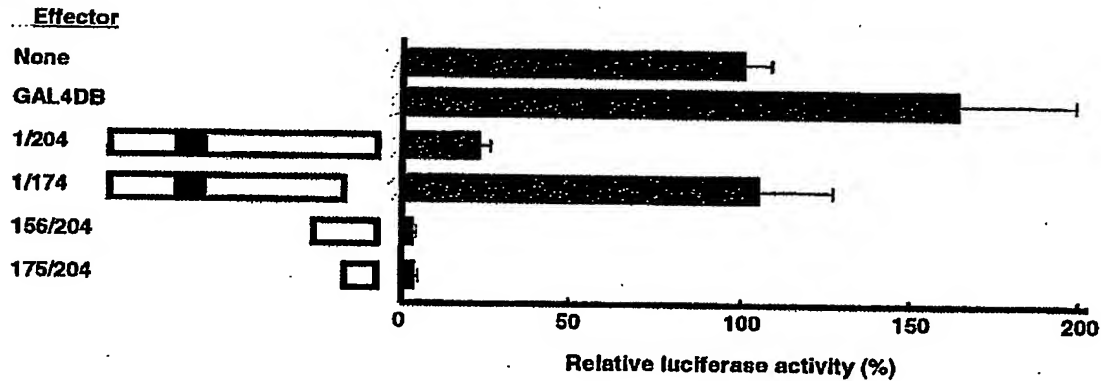


【図 7】

A



B





【図 8】

**A**

**Reporter**

GAL4GCC-LUC      5 × GAL4-4 × GCC-TATA — **LUC** — Nos

**Effector**

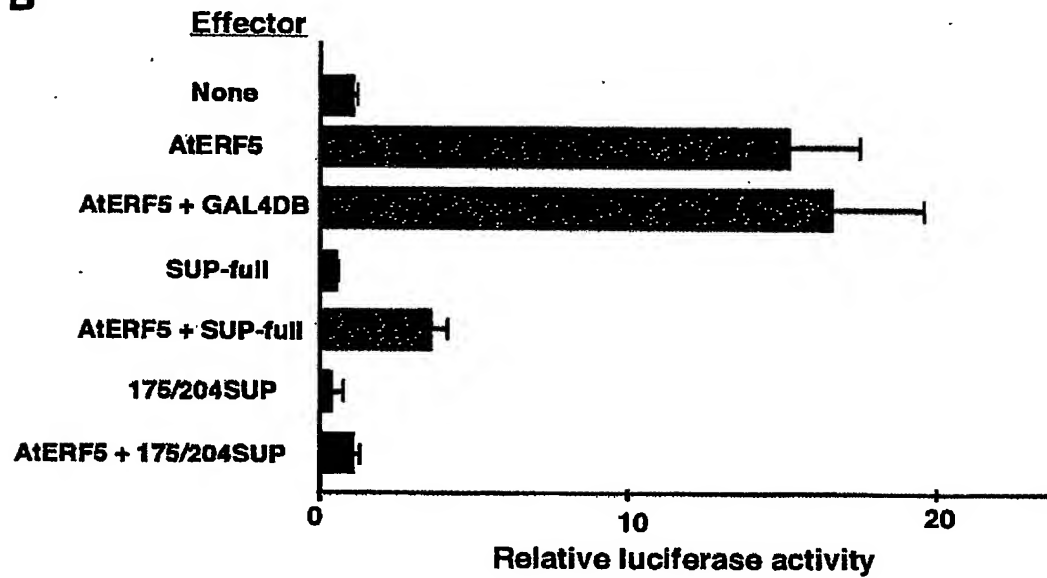
AtERF5      CaMV35S-Ω — **AtERF5** — Nos

GAL4DB      CaMV35S-Ω — **GAL4DB** — Nos

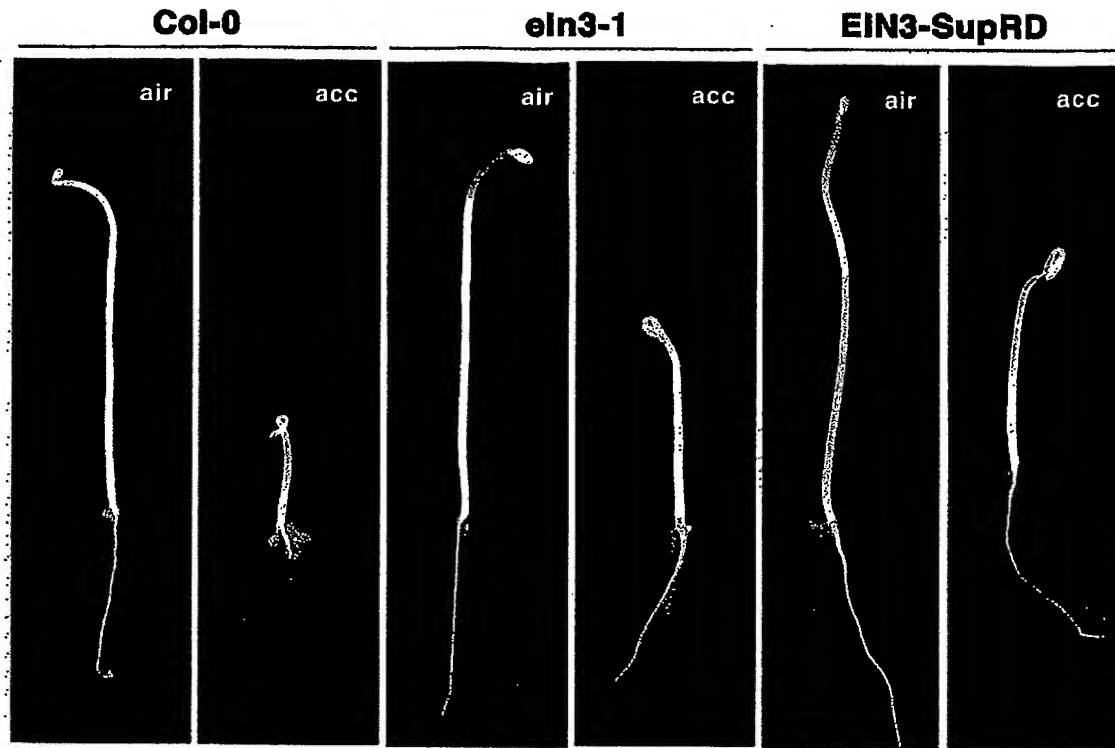
GAL4DB-SUP      CaMV35S-Ω — **GAL4DB 1/204SUP** — Nos

GAL4DB-175/204SUP      CaMV35S-Ω — **GAL4DB 174/204SUP** — Nos

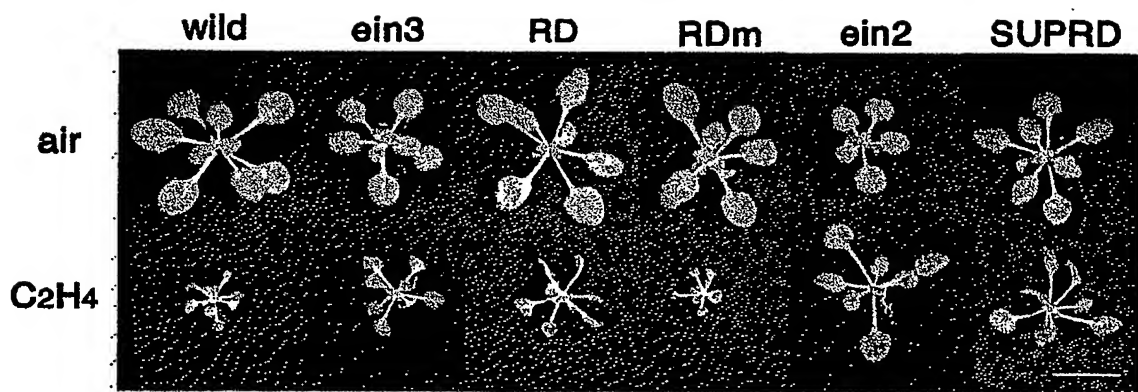
**B**



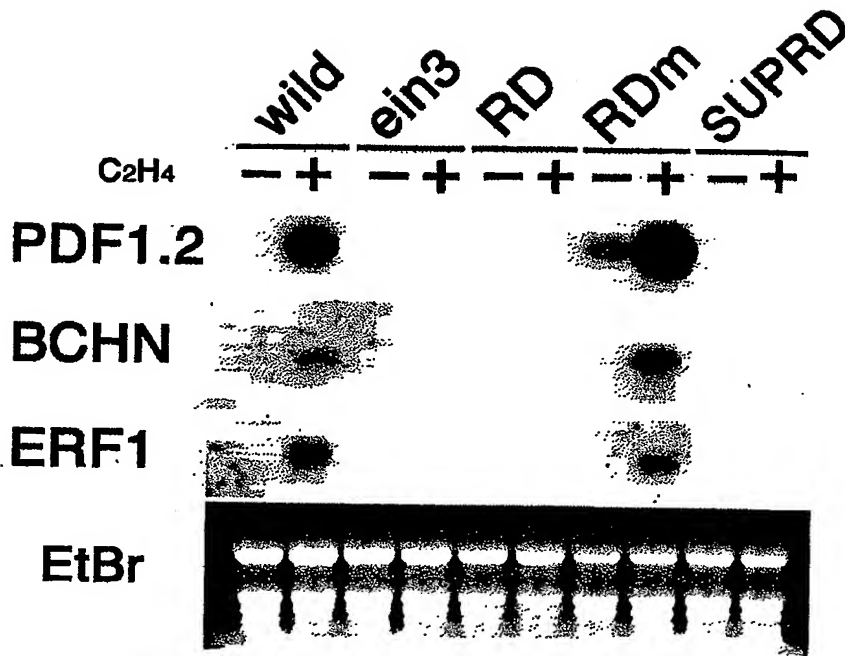
【図 9】



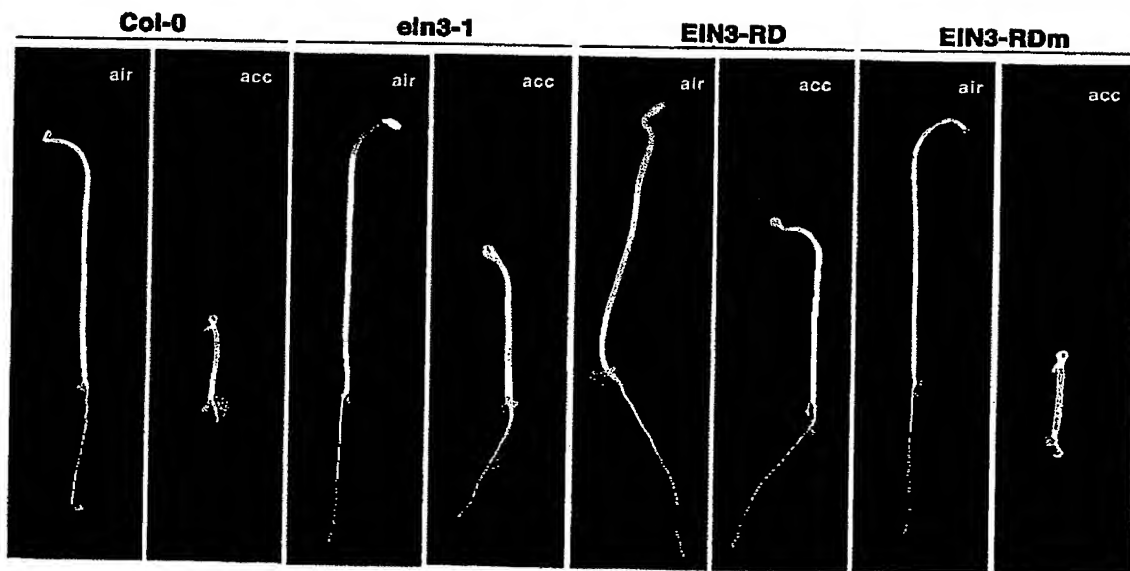
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



【書類名】 要約書

【課題】

アンチセンス法あるいはリボザイム法等にみられる標的遺伝子の塩基配列に合わせて、その都度DNAあるいはRNAの設計を行う必要なく、簡便でかつ広く適用可能な遺伝子の転写抑制手段を提供する。

【解決手段】シロイロナズナSUPERMAN（以下、SUPという。）タンパク質あるいはそのアミノ酸配列の部分配列を有するペプチドを転写因子に結合せしめたキメラタンパク質を用いるか、あるいはこのキメラタンパク質をコードする遺伝子を細胞内で生成させることにより、上記転写因子を転写抑制因子に機能転換させ、上記転写因子のDNA結合ドメインと結合する遺伝子の転写を抑制する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-395488
受付番号	50101906664
書類名	特許願
担当官	角田 芳生 1918
作成日	平成14年 1月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年12月26日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**